

10/524144

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
26. Februar 2004 (26.02.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/016263 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 31/21

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/008957

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. August 2003 (12.08.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 37 146.6 13. August 2002 (13.08.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): MEDAC GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE
SPEZIALPRÄPARATE MBH [DE/DE]; Fehlandtstrasse
3, 20354 Hamburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SASS, Gretel [DE/DE];
Osterbekstr. 62, 22083 Hamburg (DE).

(74) Anwälte: WEBER-QUITZAU, M. usw.; Uexküll & Stol-
berg, Beselerstrasse 4, 22607 Hamburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: USE OF TREOSULFAN AND DERIVATIVES THEREOF FOR TREATING MULTIPLE SCLEROSIS

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON TREOSULFAN UND DERIVATEN DAVON ZUR BEHANDLUNG DER MULTIP-
LEN SKLEROSE

(57) Abstract: The invention relates to the use of treosulfan and/or derivatives thereof for producing a pharmaceutical composition
used in the treatment of multiple sclerosis.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Treosulfan und/oder Derivaten davon zur Herstel-
lung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung der Multiplen Sklerose.

WO 2004/016263 A1

BEST AVAILABLE COPY

Verwendung von Treosulfan und Derivaten davon
zur Behandlung der Multiplen Sklerose

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Treosulfan und Derivaten davon zur Behandlung der Multiplen Sklerose.

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine neurologische Erkrankung, die weltweit mehr als eine Million Menschen betrifft. Bei der MS handelt es sich um einen entzündlichen Zustand, der das Myelin des zentralen Nervensystems (ZNS) zerstört und neurologische Beeinträchtigungen sowie häufig auch schwere Behinderungen

verursacht. Die Ätiologie der MS ist bislang unbekannt, wobei im allgemeinen angenommen wird, daß die Erkrankung durch eine Art Autoimmunprozeß vermittelt wird, der möglicherweise durch eine Infektion ausgelöst und von einer genetischen Prädisposition überlagert wird. Nach meist schleichendem, selten subakutem oder akutem Beginn im 20. bis 40. Lebensjahr wird am häufigsten ein chronisch-progredienter oder schubweiser Verlauf mit Neigung zu Remissionen beobachtet. Die unterschiedlichen Stadien und Formen der Multiplen Sklerose werden unterteilt in: Schubförmig-remittierend (relapsing-remitting; RR) MS (derzeit etwa 80-85% der MS-Patienten), primär-progressive (PP) MS, wobei mit der Zeit mehr als 50% der Patienten mit RR-MS schließlich eine bleibende Verschlechterung mit oder ohne überlagerte Rückfälle entwickelt (sekundär-progressive (SP) Form der MS). Es ist unklar, ob die verschiedenen Krankheitsverläufe auf den selben oder unterschiedlichen pathophysiologischen Prozessen beruhen.

Zur Behandlung der unterschiedlichen Stadien und Formen der MS gibt es zum Teil eindeutige Behandlungsempfehlungen, die sich in einer immunmodulatorischen Stufentherapie der MS widerspiegeln (P. Rieckmann, "Immunmodulatorische Therapie der Multiplen Sklerose: Konsensusprotokolle im deutschsprachigen Raum und Nordamerika" in: "Multiple Sklerose: Kausalorientierte, symptomatische und rehabilitative Therapie", Springer Verlag Berlin - Heidelberg - New York 2002: 109-118). Als Schubtherapie haben sich Cortikosteroide bewährt. Für die schubförmige remittierende Multiple Sklerose stehen mit Interferon β und Glatirameracetat immunologisch wirksame Substanzen zur Verfügung, die die Anzahl der Schübe reduzieren. Interferon β ist ebenfalls wirksam bei der sekundären progressiven MS, sofern in diesem Stadium noch Schübe vorhanden sind.

Für die Therapie der rein progressiven MS stehen keine eindeutig als wirksam belegten Arzneimittel zur Verfügung. Sowohl Mitoxantron als auch Cyclophosphamid oder Methotrexat kommen zur Anwendung. Gemäß der Behandlungsrichtlinie der MS Council for Clinical Practice Guidelines von 2002 (D.S. Goodin et al., Neurology 58 (2002) 169-178) wird die Effektivität dieser Substanzen als möglich angesehen. Da bei Mitoxantron ab einer kumulativen Dosierung von 160 mg/m² kardiale Nebenwirkungen auftreten (Fachinformation "Novantron®" (Wyeth Pharma GmbH), Januar 2002, Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V./FachInfo-Service, D-88322 Aulendorf), weil bei Cyclophosphamid unter anderem Schäden der ableitenden Harnwege möglich sind und Methotrexat häufig gastrointestinale Nebenwirkungen aufweist, werden nebenwirkungsärmere mindestens äquieffektive Alternativen benötigt.

Im Hinblick auf die noch immer bestehenden Probleme bei der Suche nach geeigneten Wirkstoffen zur Behandlung von MS ist es daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Arzneimittel bereitzustellen, das zur Behandlung von MS (einschließlich aller Verlaufsformen) geeignet ist und das die bei den bislang eingesetzten Wirkstoffen bekannten Nachteile nicht aufweist.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Verwendung von Treosulfan oder Derivaten davon gelöst.

Es hat sich im Rahmen der vorliegenden Erfindung überraschenderweise gezeigt, dass Treosulfan nicht nur außerordentlich gut verträglich ist, sondern bei MS-Patienten zu einer deutlichen Verbesserung des Krankheitsverlaufs geführt hat.

Am Beispiel der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), die als Tiermodell der menschlichen MS anerkannt ist, wurde zunächst die Wirksamkeit von Treosulfan überprüft. Die Effektivität der Treosulfan-Behandlung wurde im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe und einer Gruppe, die Mitoxantron verabreicht bekam, untersucht. In ersten Versuchen wurde Treosulfan am Tag der Immunisierung appliziert, in einem weiteren an Tag 14 nach Immunisierung. Die bis zu diesem Tag manifesten Schäden konnten zwar nicht rückgängig gemacht werden, im Gegensatz zur (unbehandelten) Kontrollgruppe, bei der die Erkrankung weiter fortschritt, war bei der mit Treosulfan behandelten Gruppe eine Stabilisierung zu beobachten. Bei zahlreichen Versuchstieren trat allerdings eine auffällige Besserung ein. Bemerkenswert war ferner, daß in der Treosulfan-Gruppe 7 von 8 Tieren an Tag 53 noch lebten, während in der Vergleichsgruppe lediglich 2 von 8 Tieren zu diesem Zeitpunkt noch am Leben waren. In der Vergleichsgruppe, die Mitoxantron erhielt, wurde keine bessere Effektivität beobachtet als in der Treosulfan-Gruppe.

Bei Treosulfan handelt es sich um (2S,3S)-Threitol-1,4-bismethansulfonat (L-Threitol-1,4-bis(methansulfonat); Chemical Abstracts Registry No. 299-75-2):



Erfindungsgemäß sind auch Derivate von Treosulfan eingeschlossen, wie z.B. Busulfan ((1,4-Bis(methylsulfonyloxy)-butan), Dimethylbusulfan (1,4-Bis(methylsulfonyloxy)-1,4-dimethylbutan; CA Registry No. 55-93-6), Pentasulfan (1,5-Dimesyloxypentan; CA Registry No. 2374-22-3), Hepsulfam (1,7-

Heptanedioldisulfamat; CA Registry No. 96892-57-8) oder ähnliche Substanzen, die in ersten Kontrollversuchen zu ähnlichen Ergebnissen geführt haben wie Treosulfan. In Betracht kommen auch Treosulfan-Derivate, bei denen die Methylgruppen am Schwefelatom ausgetauscht (beispielsweise durch (niedere) Alkylsubstituenten (linear oder verzweigt), insbesondere mit 1 bis 7 C-Atomen, wie z.B. Ethyl-, Propyl-, Butyl-, Pentyl-, Hexyl- und Heptyl- usw.) oder substituiert (Ersatz eines/mehrerer Wasserstoffatome durch einen/mehrere Substituenten, wie z.B. Isopropyl, Tertiärbutyl sind.

Busulfan wurde bislang ausschließlich zur Konditionierung von Patienten vor Stammzelltransplantation eingesetzt (vgl. Openshaw et al., Biology of Blood and Marrow Transplantation 2000, 6:563-575), mit dem Ziel, das Anwachsen des Transplantats zu fördern. Demgegenüber wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung überraschenderweise gefunden, daß sich Treosulfan und/oder dessen Derivate, einschließlich Busulfan, direkt zur Behandlung von MS eignen. Gegenüber dem risikoreichen und aufwendigen Ansatz der Stammzelltransplantation stellt die Erfindung eine unabhängige und erfolgreiche Alternative dar.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher die Verwendung von Treosulfan und Derivaten davon zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von MS. Als Derivate werden beispielsweise die oben genannten Substanzen eingesetzt. Erfindungsgemäß eingeschlossen sind ferner Kombinationen von Treosulfan und/oder einem Derivat davon mit einer oder mehreren immunmodulatorischen Substanzen, d.h. Kombinationspräparate, die neben Treosulfan und/oder einem Derivat davon eine oder mehrere immunmodulatorisch wirksame Substanzen, wie z.B. Interferon- (IFN-) und/oder Glatriameracetat, als weiteren Wirkstoff enthalten.

Die pharmazeutische Zusammensetzung liegt vorzugsweise in Form einer zur intravenösen Applikation (Infusion) geeigneten Lösung vor, es kann aber auch eine orale Formulierung in Betracht kommen.

Die Dosierung liegt bei 1 bis 10 g, vorzugsweise 3 bis 9 g und besonders bevorzugt 5 bis 8 g Treosulfan (und/oder Treosulfan-Derivat) pro m² Körperoberfläche.

Die pharmazeutische Zusammensetzung dient zur Behandlung der multiplen Sklerose, einschließlich der Behandlung der schubförmig-remittierenden, der primär progressiven und insbesondere der sekundär progressiven MS.

Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen näher erläutert.

Beispiele

1. Vorarbeiten

Es wurden zunächst mehrere Versuche zur Dosisfindung von Treosulfan in DA-Ratten, einem speziellen für diese Versuche geeigneten Rattenstamm (Stamm Dark-Agouti), mit Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG)-induzierter experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE) durchgeführt. Diese Ratten stellen ein sehr gutes Modell für die Multiple Sklerose (MS) dar, da der klinische Verlauf und die Läsionsmorphologie

(Entzündung, Entmarkung, Verlust von Axonen und Nervenzellen) der MS reproduziert werden können.

Es zeigte sich eine einmalige intraperitoneal verabreichte Dosis von 1 g/kg Körpergewicht als verträglich und fähig, die Krankheit zu unterdrücken (siehe Figur 1). Die injizierten Tiere zeigten zu Beginn der Behandlung lediglich eine deutliche Gewichtsabnahme.

2. Untersuchung der Treosulfan-Wirkung auf die MOG-EAE

2.1 Klinische Charakterisierung

DA-Ratten (10 Tiere je Gruppe) wurden entweder mit einer einmaligen Dosis Treosulfan (0,5 g/kg Körpergewicht) am Tag der Immunisierung (p.i.) behandelt oder mit einer dreimaligen Treosulfan-Applikation (0,5 g/kg Körpergewicht je Applikation) im Abstand von 1 Tag. Als Kontrolle wurde PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) verabreicht. In einem weiteren Experiment wurde Treosulfan (einmalige Dosis: 0,5 g/kg Körpergewicht) 2 Wochen nach erfolgter Immunisierung verabreicht. Die Gesamtzahl der Ratten betrug 30 Tiere. Die Tiere wurden für die Dauer von 40 Tagen nach Initiierung des Experiments klinisch beobachtet und regelmäßig neurologisch untersucht.

2.2 Histopathologische Untersuchung der Läsionen

Am Tag 40 wurden die Ratten perfundiert und das zentrale Nervensystem (ZNS) histopathologisch analysiert (im Hinblick auf

Entzündung, Entmarkung und Axonverlust). (R. Weissert et al., J. Clin. Invest. 102 (1998), 1265 - 1273).

2.3 Immunologische Charakterisierung

In einem zweiten Experiment wurden jeweils fünf Ratten am Tag 12 und Tag 40 (Gesamtzahl der Tiere: $n = 30$) nach Immunisierung immunologisch in bezug auf T- und B-Zell-Antworten charakterisiert (EliSpot (Autoimmun Diagnostika GmbH, D-72479 Strassberg) für IFN- sezernierende Zellen, Proliferation, Auto-Antikörperanalyse). (R. Weissert et al., J. Immunol. 160 (1989) 681 - 690).

2.4 Hämatologische Charakterisierung

Zur Analyse des hämatologischen Status wurde den Ratten am Tag 0, Tag 5, Tag 14 und Tag 53 nach Immunisierung Blut entnommen und eine Bestimmung von Hämoglobin (Hb), Retikulozyten, Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten durchgeführt.

2.5 Ergebnisse

Die oben genannten Daten wurden zur Absicherung präliminärer Daten aus Dosis-Findungsversuchen mit einer aussagefähigen Anzahl an Tieren erhoben.

Die Ergebnisse sind in den Figuren 1 - 17 dargestellt. Die erhaltenen Ergebnisse belegen zunächst die Effektivität der Treosulfan Behandlung im Vergleich zu der unbehandelten

Kontrollgruppe, die in den Figuren 1 - 3a dargestellt ist. Figur 4 zeigt die Effektivität von Mitoxantron unter den gleichen Versuchsbedingungen. Figur 3 bzw. 3a sind unterschiedliche Darstellungen des Experiments, in der Treosulfan an Tag 14 nach der Immunisierung verabreicht wurde. Die bis zu diesem Tag manifesten Schäden konnten naturgemäß nicht rückgängig gemacht werden. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe, bei der die Erkrankung weiter fortschritt war allerdings bei der mit Treosulfan behandelten Gruppe eine Stabilisierung zu beobachten. Bei einigen Versuchstieren trat sogar eine auffällige Besserung ein.

Ferner wurde festgestellt, daß in der mit Treosulfan behandelten Gruppe 7 von 8 Tieren an Tag 53 noch lebten, während in der Vergleichsgruppe (unbehandelte Tiere) lediglich 2 von 8 Tieren noch am Leben waren.

Die Verträglichkeit von Treosulfan ist in den Figuren 5 - 15 dargestellt. Veränderungen des Blutbildes werden nicht dokumentiert.

Beobachtet wurde ferner, dass die Interleukin 12 (IL-12) bzw. Interferon- (IFN-)-Werte in der Treosulfan-Gruppe erniedrigt waren (Figur 16, 17). (R. Weissert et al., J. Immunol. 166 (2001) 7588 - 7599).

3. Durchführung von Heilversuchen an MS-Patienten

In einem ersten Heilversuch wurden 5 Patienten mit sekundär progressiver MS (SPMS-Patienten) behandelt. Es handelte sich um 3 Männer im Alter von 51/58/62 Jahren und zwei Frauen im Alter von 39/41 Jahren.

Im Rahmen der Therapie wurde Treosulfan in Form einer zur intravenösen Applikation (Infusion) geeigneten Lösung verabreicht. Die Patienten wurden mit einer Dosierung von jeweils 5 g/m² Körperoberfläche im Abstand von 4 Wochen im ersten Quartal behandelt. Anschließend erfolgte pro Quartal eine jeweils einmalige Treosulfan Applikation (5 g/m² Treosulfan).

Bei zwei Patienten war eine Verbesserung des Ambulationsindex (S.L. Hauser et al. N. Engl. J. Med. 308 (1983) 173 - 178) zu sehen. Substanzbezogene Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet.

Beschreibung der Figuren:

- Fig. 1: Einmalige i.p. Behandlung der MOG-EAE mit Treosulfan am Tag der Immunisierung.
- Fig. 2: Einmalige i.p. Behandlung der MOG-EAE mit Treosulfan am Tag der Immunisierung (Wiederholung des Versuchs).
- Fig. 3a: Einmalige Behandlung der MOG-EAE mit Treosulfan an Tag 14 nach der Immunisierung - andere Darstellung des Experiments.
- Fig. 3: Einmalige Behandlung der MOG-EAE mit Treosulfan an Tag 14 nach der Immunisierung.
- Fig. 4: Einmalige i.p. Behandlung der MOG-EAE mit Mitoxantron am Tag der Immunisierung.
- Fig. 5: Erythrozyten in der MOG-EAE-Behandlung mit Treosulfan an Tag 0.
- Fig. 6: Hämoglobin (Hb) in der MOG-EAE-Behandlung mit Treosulfan an Tag 0.
- Fig. 7: Retikulozyten in der MOG-EAE-Behandlung mit Treosulfan an Tag 0.
- Fig. 8: Leukozyten in der MoG-EAE-Behandlung mit Treosulfan an Tag 0.
- Fig. 9: Thrombozyten in der MOG-EAE-Behandlung mit Treosulfan an Tag 0.

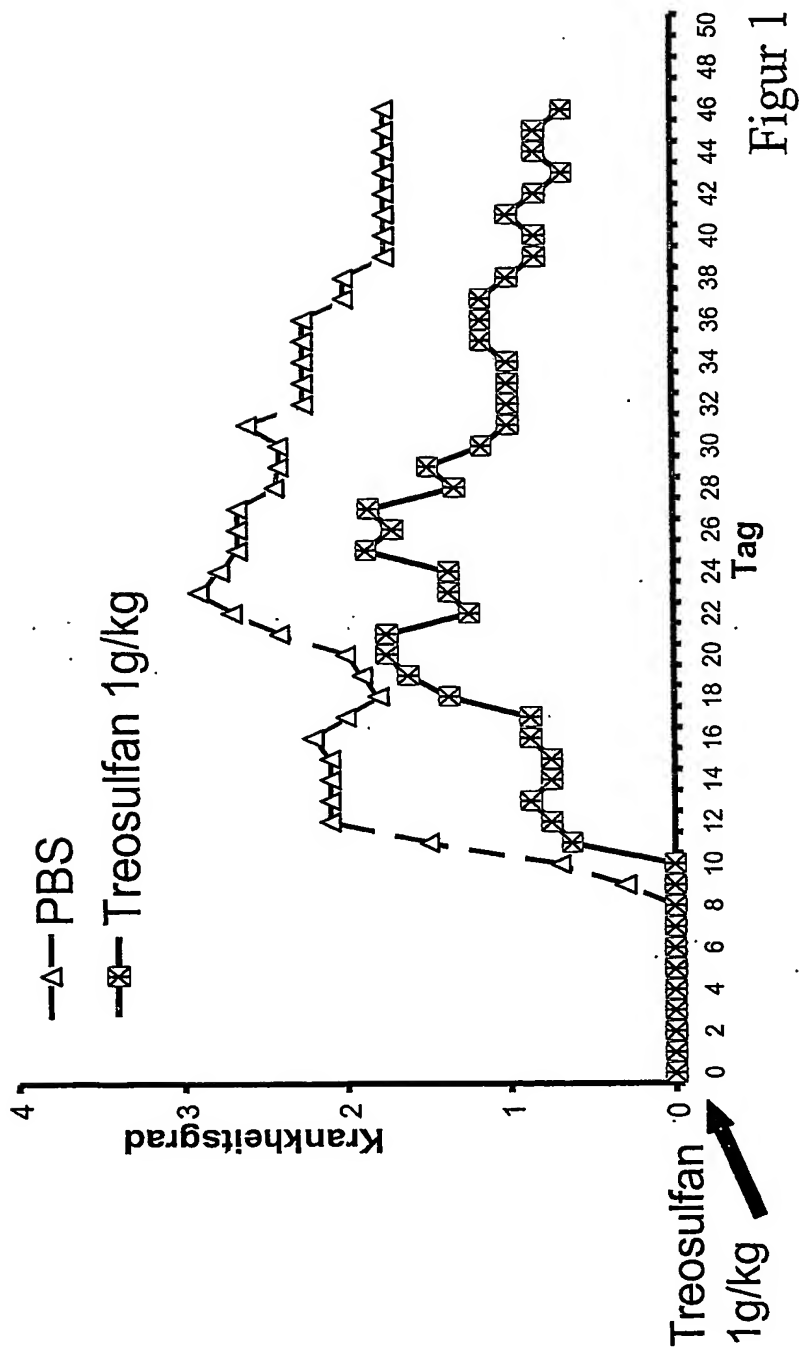
- Fig. 10: Erythrozyten in der MOG-EAE-Behandlung mit Treosulfan an Tag 14 p.i.
- Fig. 11: Hämoglobin (Hb) in der MOG-EAE-Behandlung mit Treosulfan an Tag 14 p.i.
- Fig. 12: Retikulozyten in der MOG-EAE-Behandlung mit Treosulfan an Tag 14 p.i.
- Fig. 13: Leukozyten in der MOG-EAE-Behandlung mit Treosulfan an Tag 14 p.i.
- Fig. 14: Thrombozyten in der MOG-EAE-Behandlung mit Treosulfan an Tag 14 p.i.
- Fig. 15: Einmalige i.p. Injektion 1000 mg/kg Treosulfan.
- Fig. 16: Quantitative PCR für IFN- γ -Behandlung mit Treosulfan an Tag 0.
- Fig. 17: Quantitative PCR für IL-12-Behandlung mit Treosulfan an Tag 0.

Patentansprüche

1. Verwendung von Treosulfan und/oder Derivaten davon zur Behandlung von Multipler Sklerose (MS).
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die MS eine schubförmig-remittierende, primär progressive oder sekundär progressive MS ist.
3. Verwendung nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Derivat Busulfan, Dimethylbusulfan, Pentasulfan oder Hepsulfam ist.
4. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 3, , dadurch gekennzeichnet, daß das Treosulfan oder das Derivat davon in einer zur Verabreichung von 1 bis 10 g Treosulfan und/oder Treosulfan-Derivat pro m^2 Körperoberfläche geeigneten Form vorliegt.
5. Verwendung nach Anspruch 4 zur Verabreichung von 3 bis 9 oder 5 bis 8 g Treosulfan und/oder Treosulfan-Derivat pro m^2 Körperoberfläche.
6. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 5, , dadurch gekennzeichnet, daß man Treosulfan und/oder ein Derivat davon in Kombination mit einer oder mehreren immunmodulatorisch wirksamen Substanzen verwendet.

7. Verwendung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die immunmodulatorisch wirksame Substanz Interferon- und/oder Glatriameracetat ist.
8. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 7 in Form einer Infusionslösung oder einer oralen Formulierung.

Einmalige i.p. Behandlung der MOG-EAE mit Treosulfan am Tag der Immunisierung

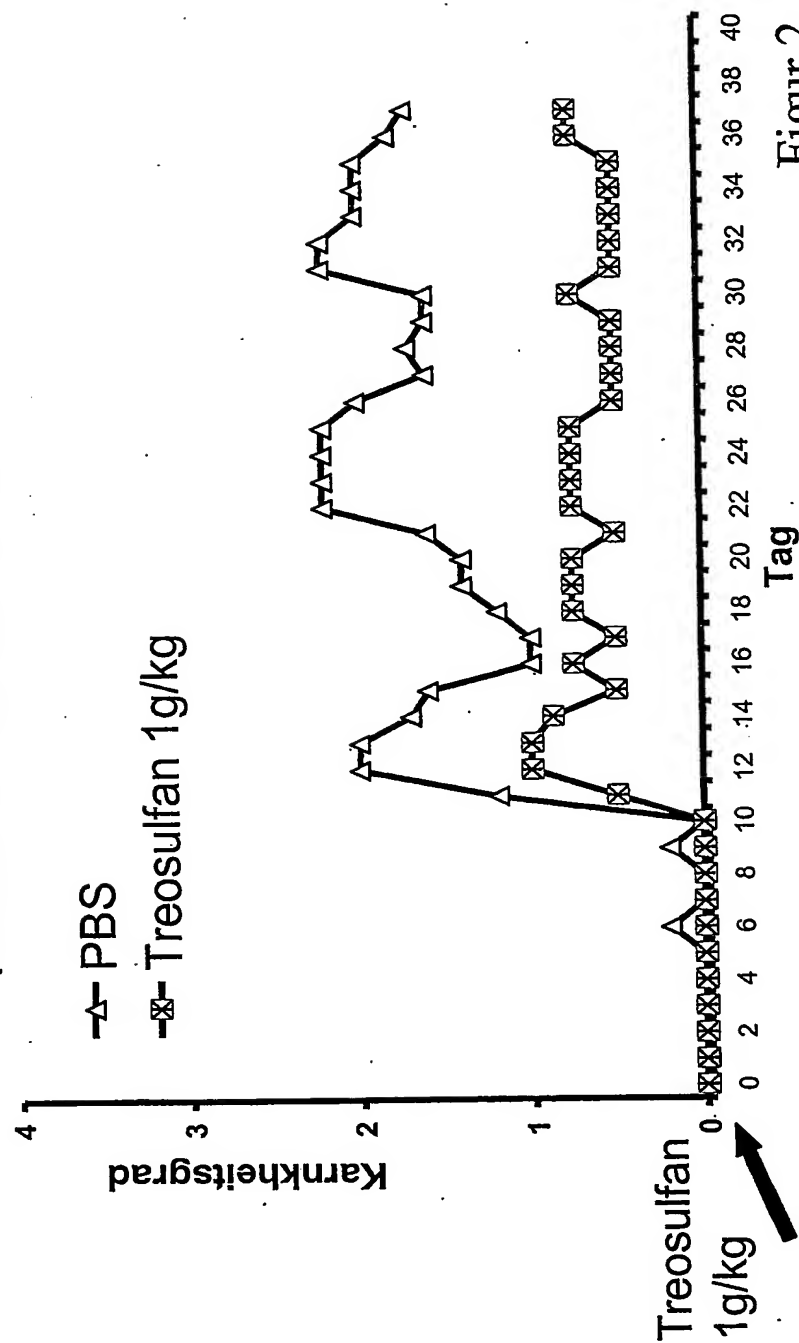


Figur 1

2/18

Einmalige i.p. Behandlung der
MOG-EAE mit Treosulfan am Tag der Immunisierung

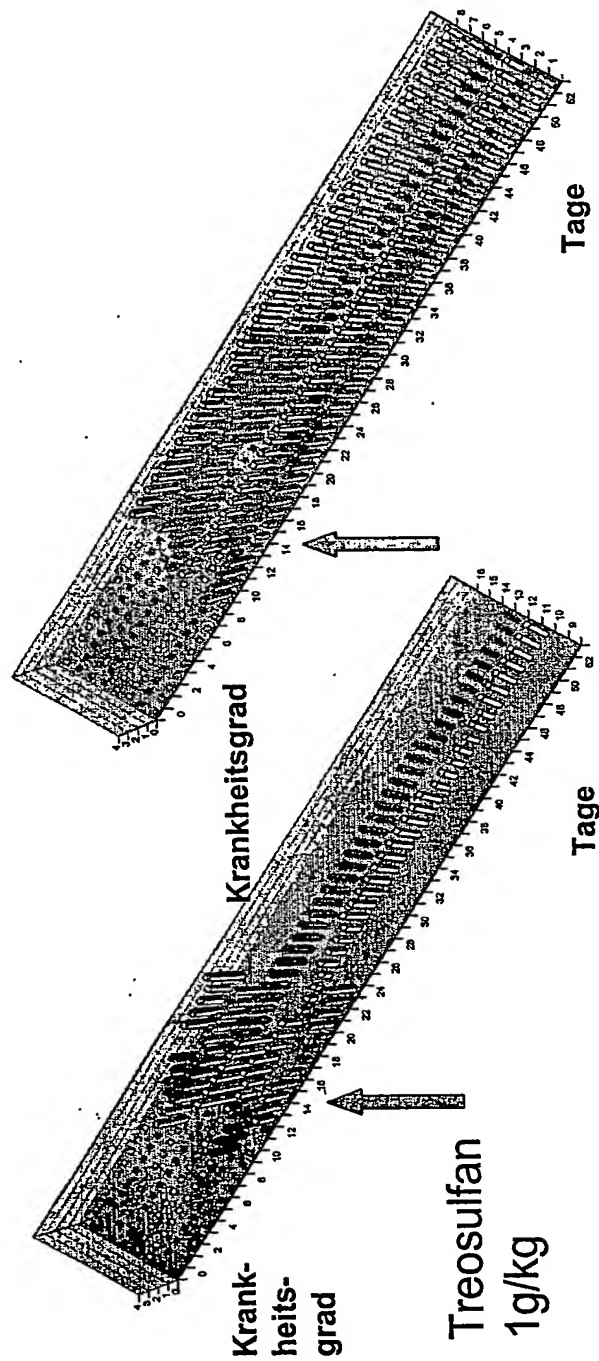
(Wiederholung des Versuchs)



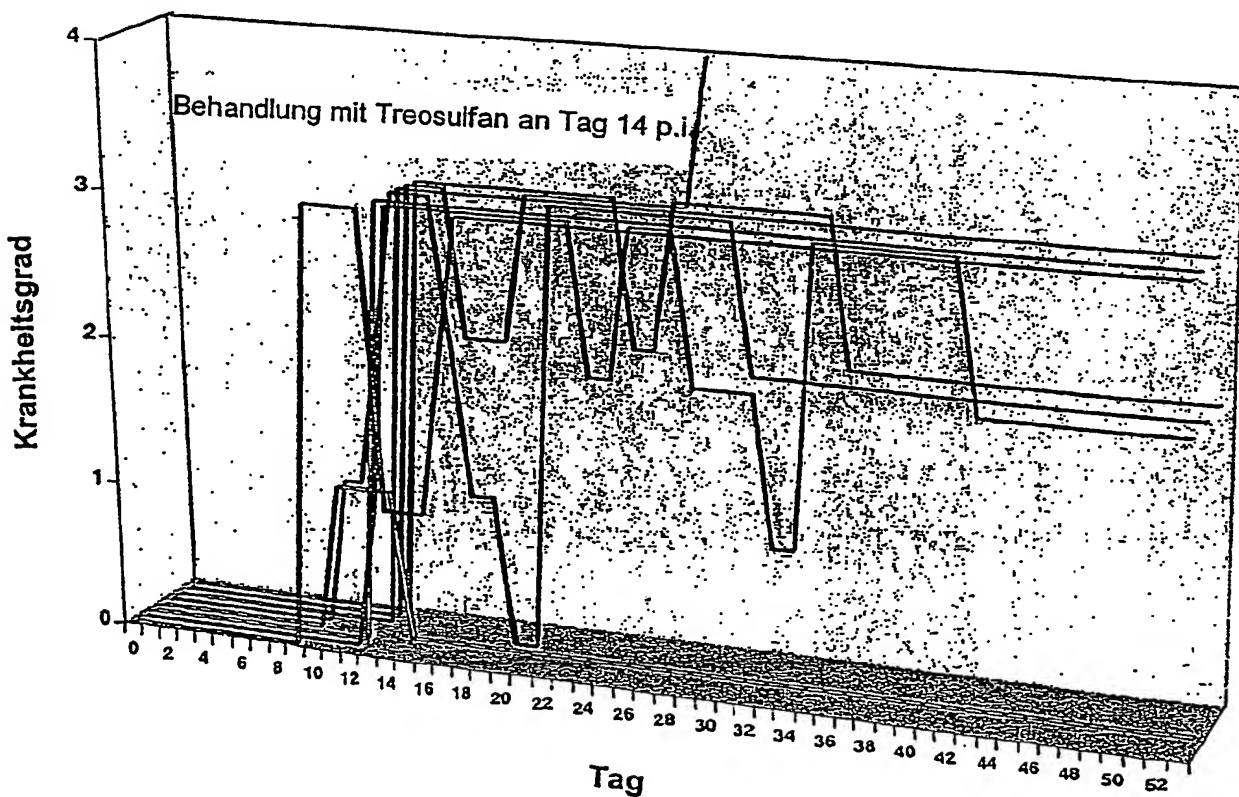
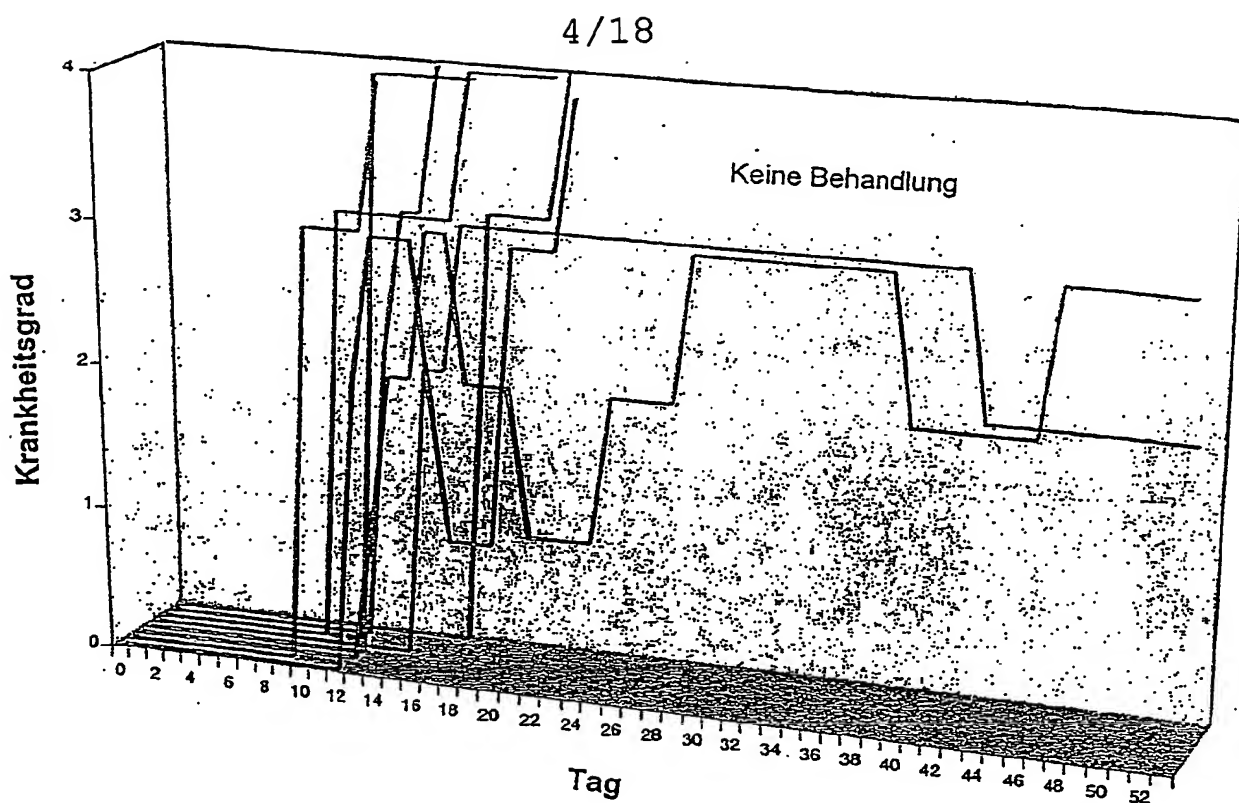
Figur 2

3/18

Einmalige Behandlung der MOG-EAE mit Treosulfan an Tag 14 nach der Immunisierung



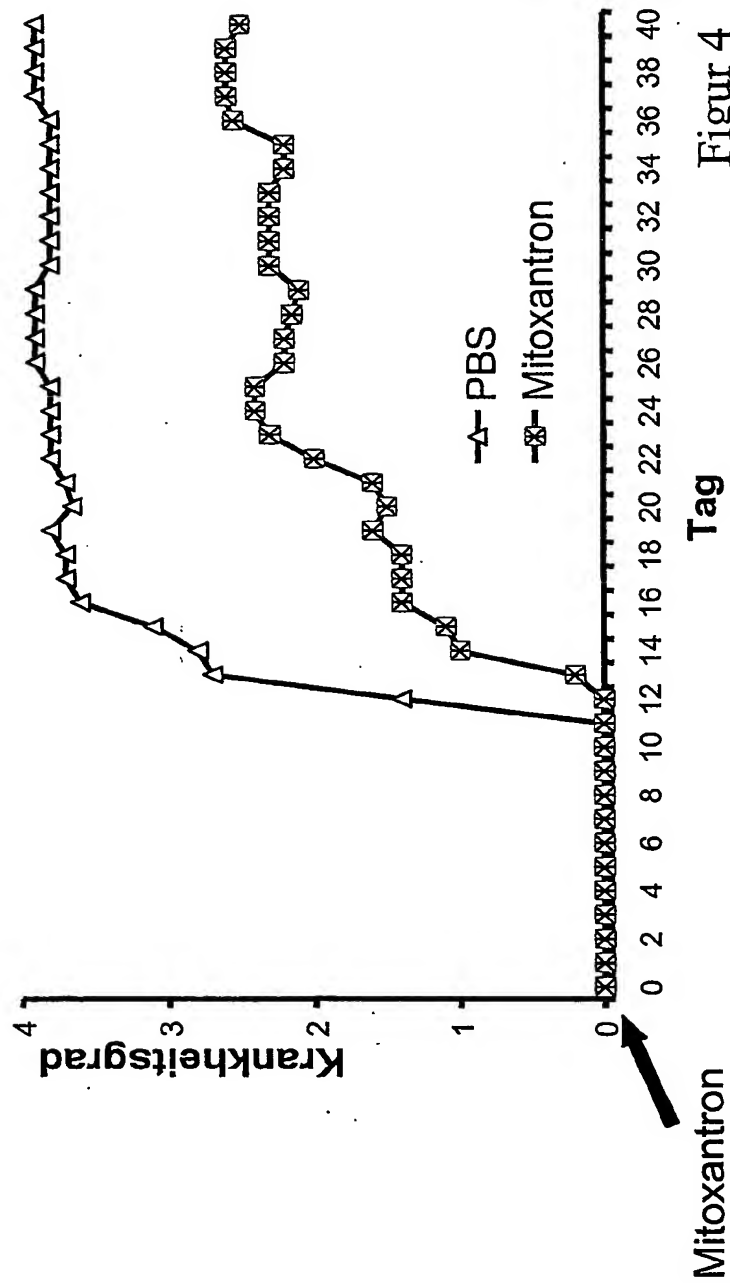
Figur 3



Figur 3 a

5/18

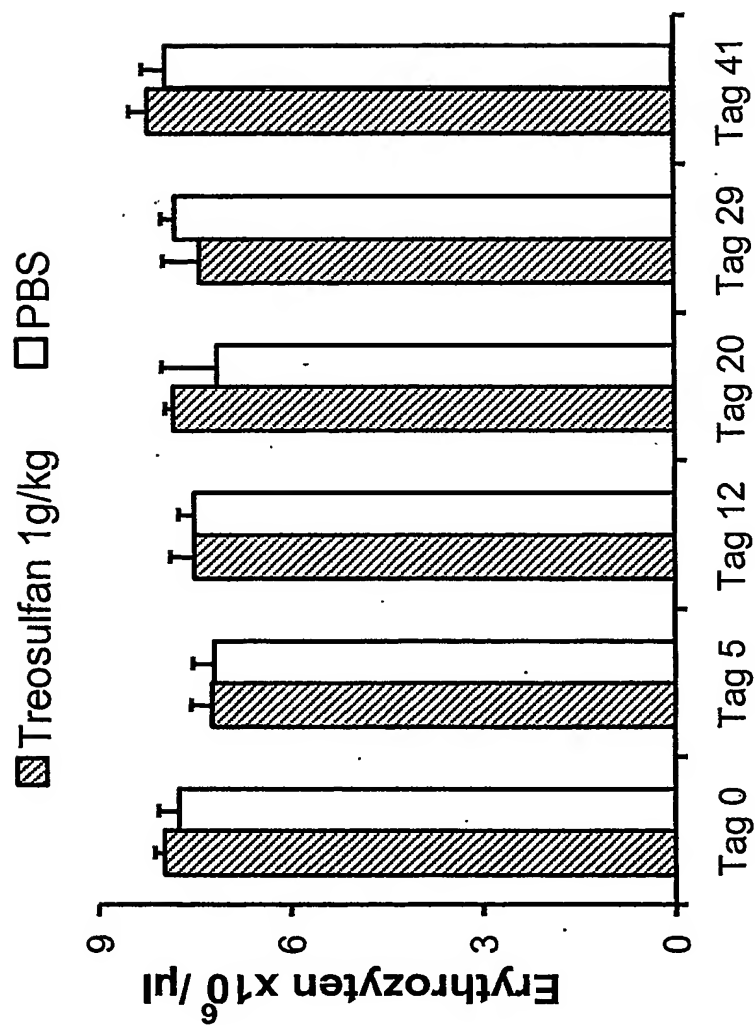
Einmalige i.p. Behandlung der MOG-EAE mit
Mitoxantron am Tag der Immunisierung



Figur 4

6/18

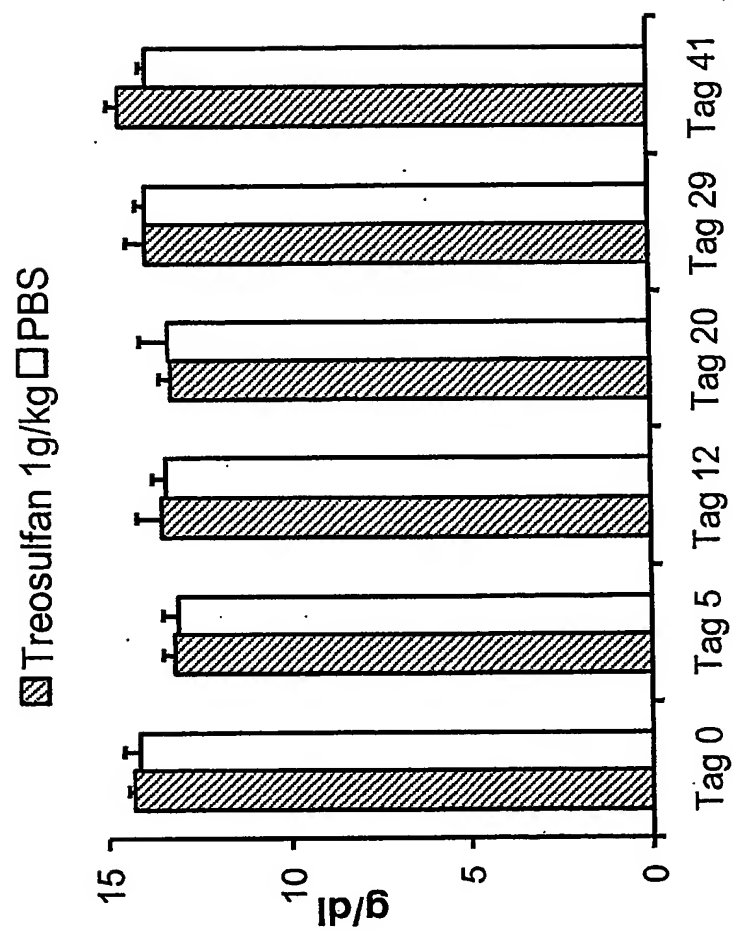
Erythrozyten in der MOG-EAE – Behandlung mit Treosulfan an Tag 0



Figur 5

7/18

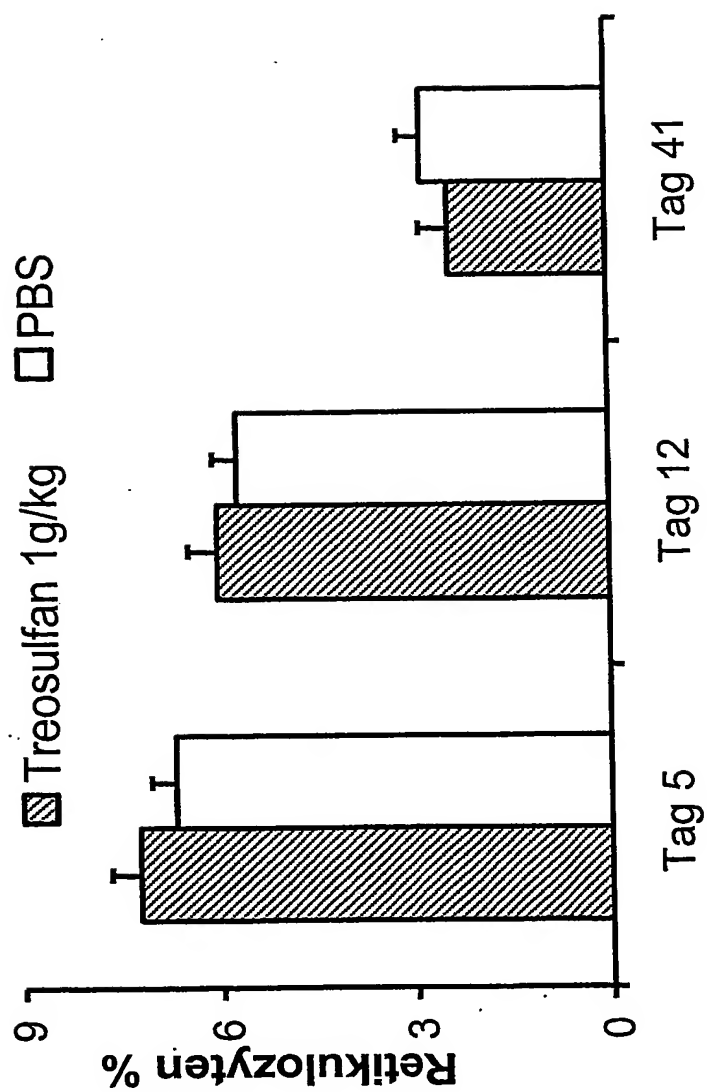
Hb in der MOG-EAE –
Behandlung mit Treosulfan an Tag 0



Figur 6

8/18

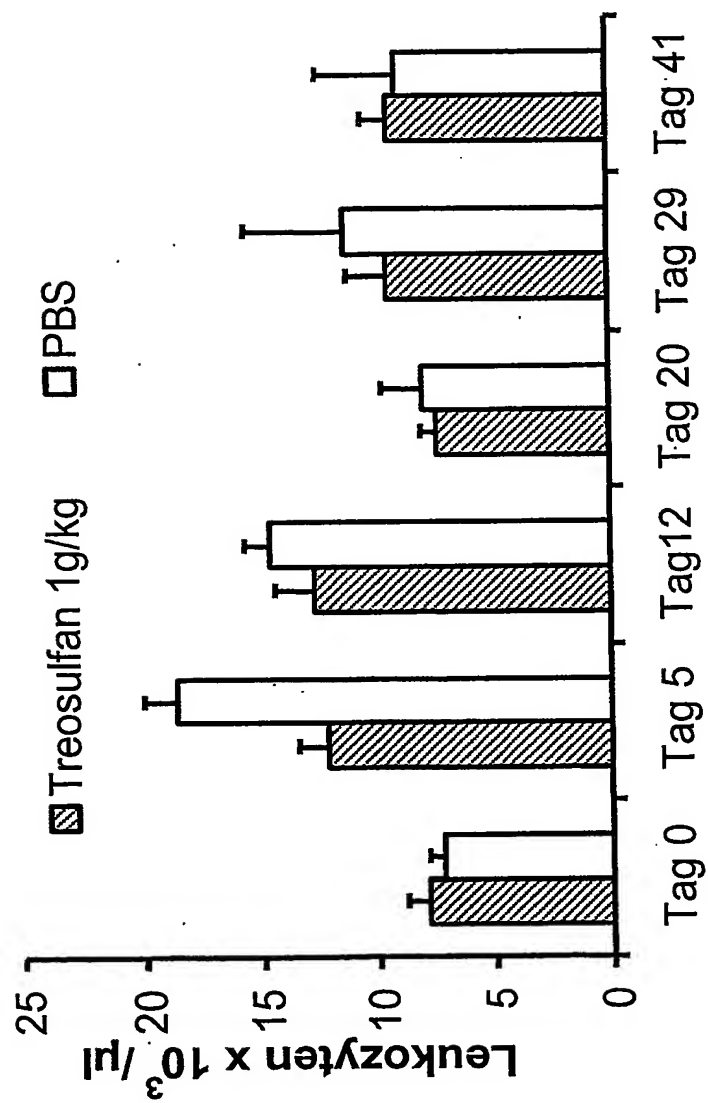
Retikulozyten in der MOG-EAE –
Behandlung mit Treosulfan an Tag 0



Figur 7

9/18

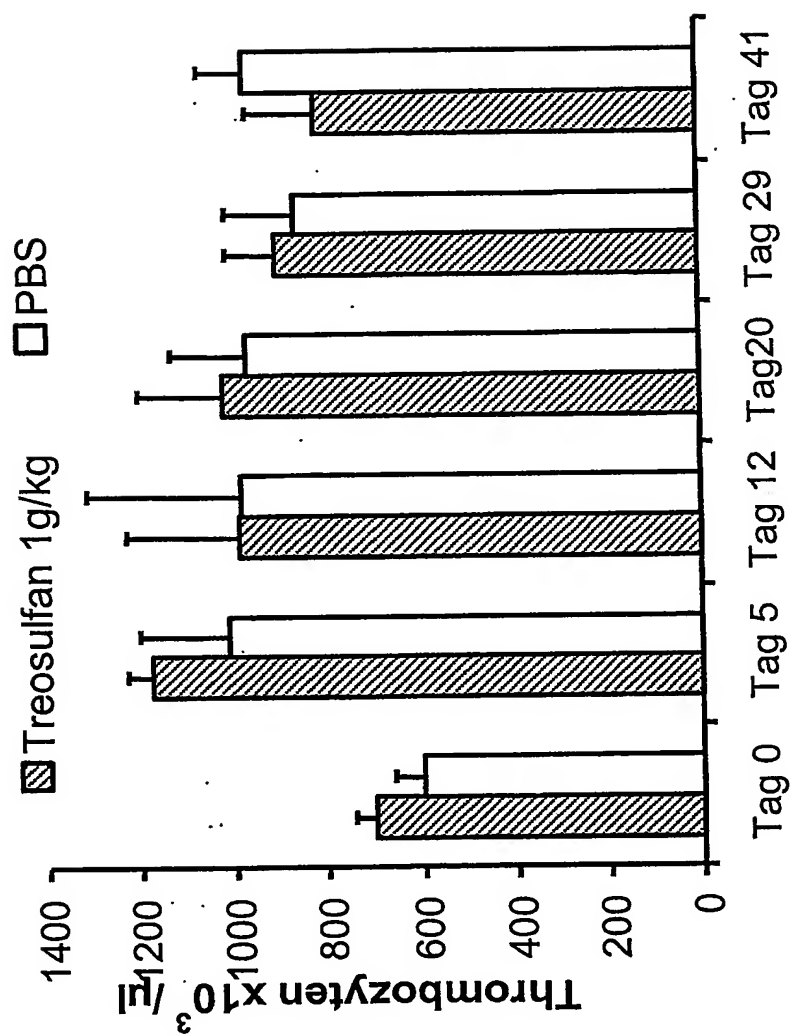
Leukozyten in der MOG-EAE –
Behandlung mit Treosulfan an Tag 0



Figur 8

10/18

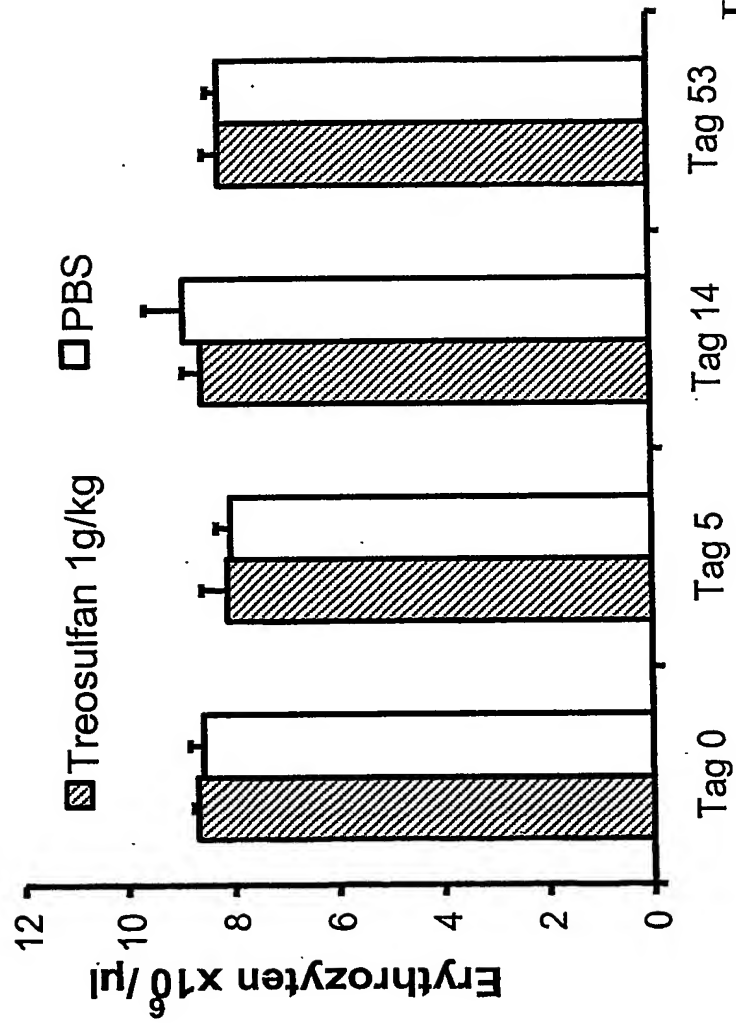
Thrombozyten in der MOG-EAE –
Behandlung mit Treosulfan an Tag 0



Figur 9

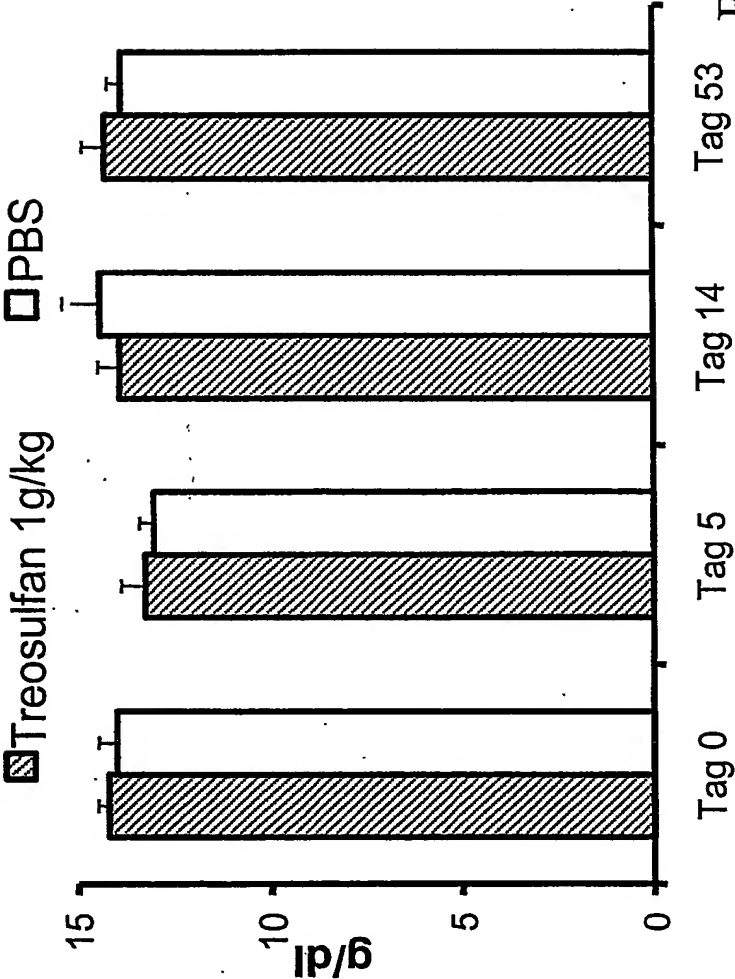
11/18

Erythrozyten in der MOG-EAE – Behandlung mit
Treosulfan an Tag 14 p.i.



Figur 10

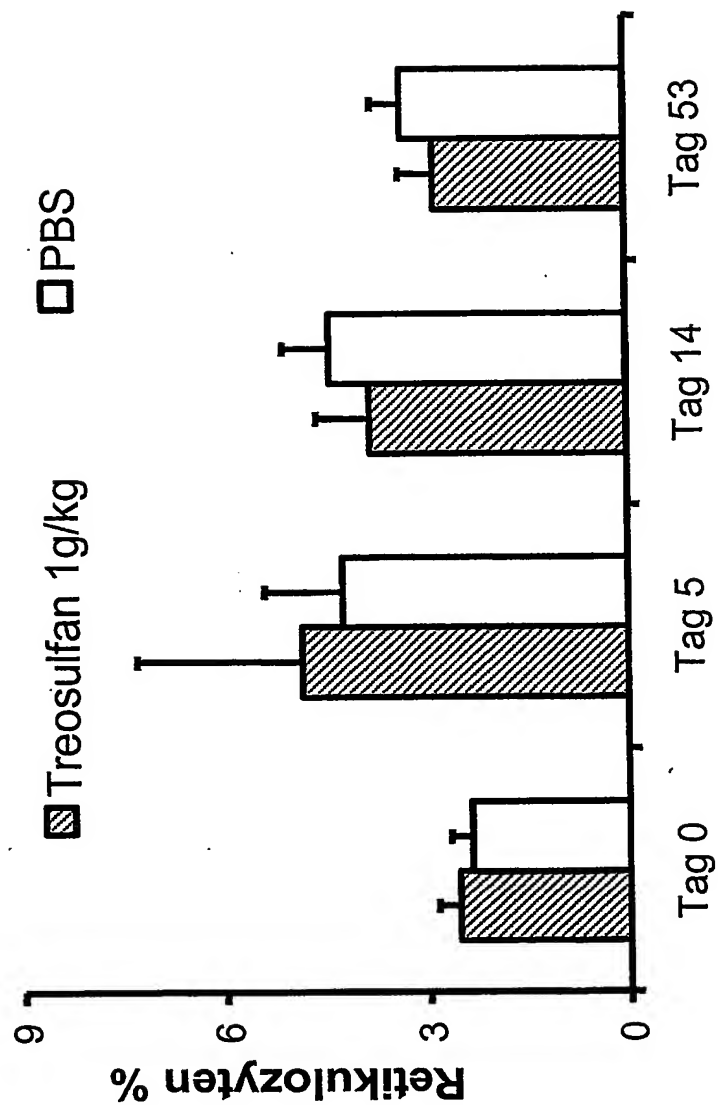
Hb in der MOG-EAE –
Behandlung mit Treosulfan an
Tag 14 p.i.



Figur 11

13/18

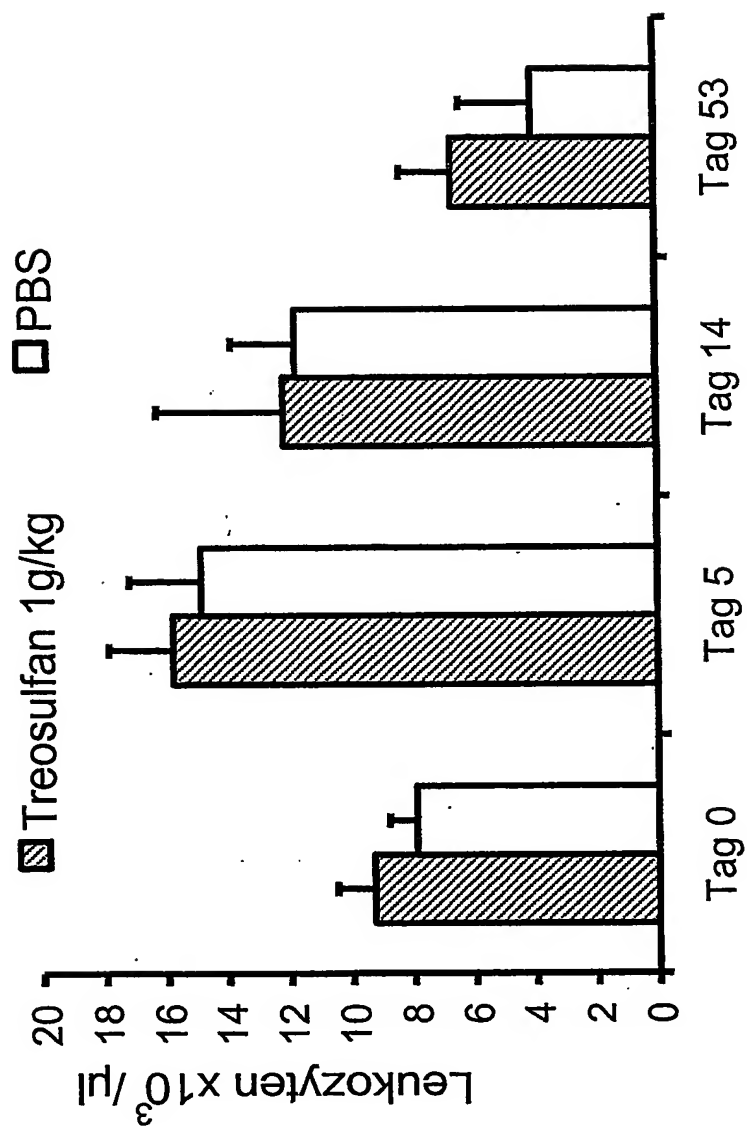
Retikulozyten in der MOG-EAE –
Behandlung mit Treosulfan an
Tag 14 p.i.



Figur 12

14/18

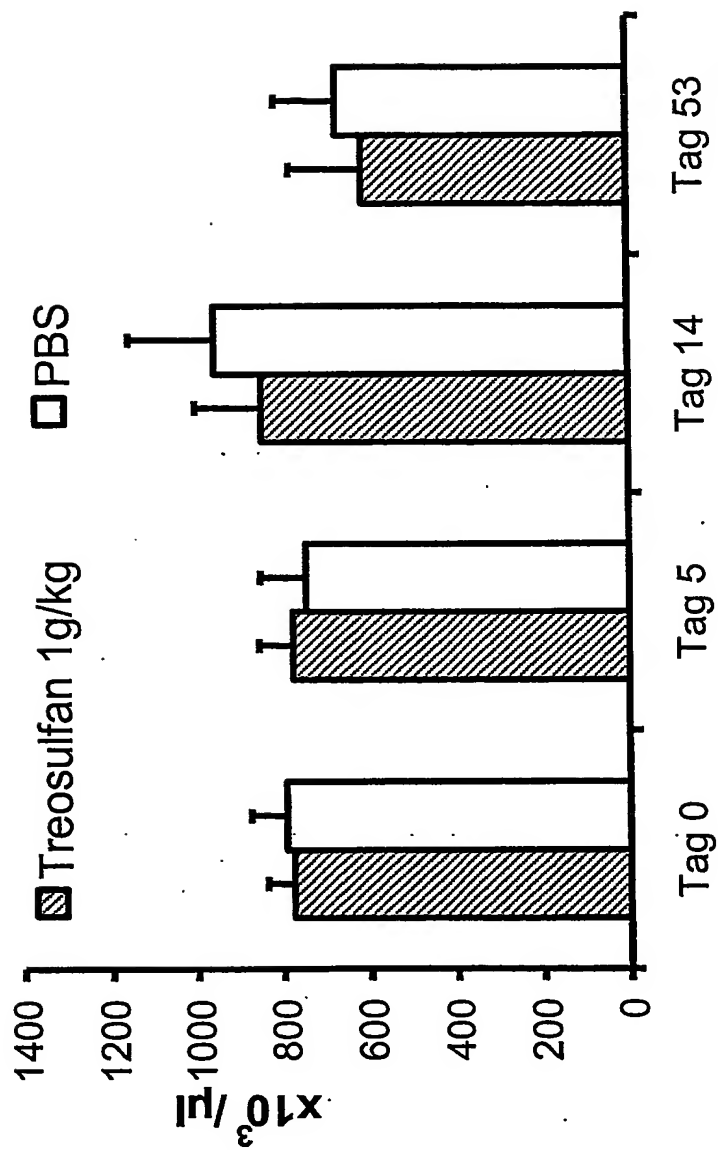
Leukozyten in der MOG-EAE –
Behandlung mit Treosulfan an
Tag 14 p.i.



Figur 13

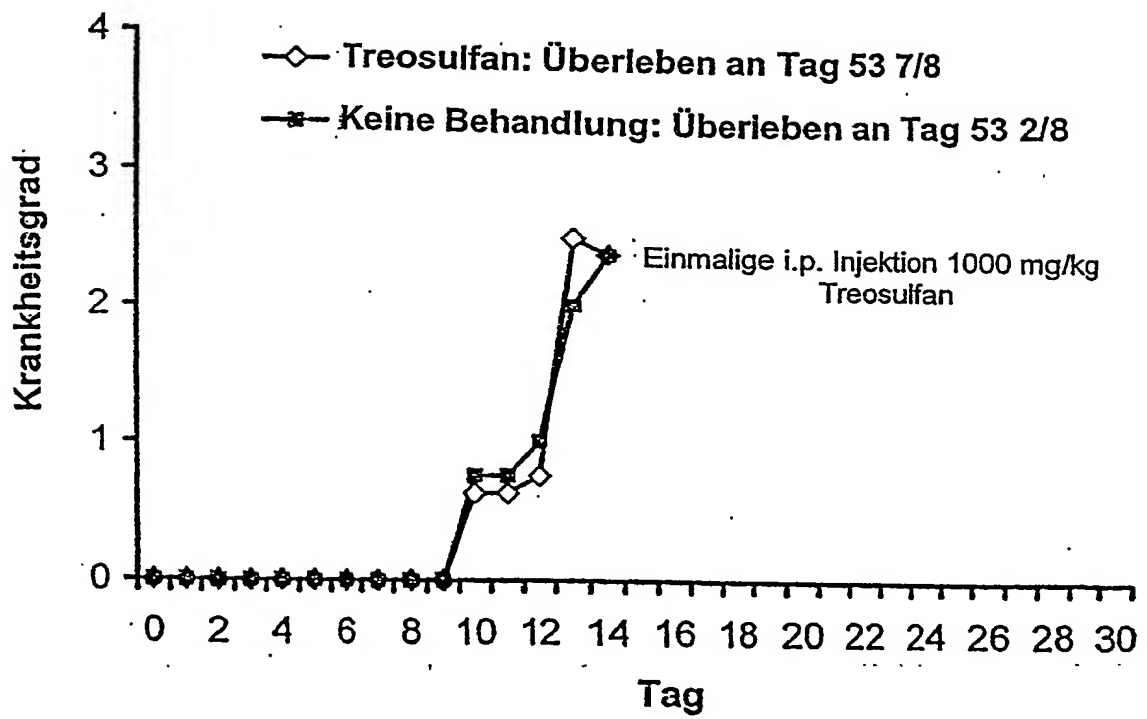
15/18

Thrombozyten in der MOG-EAE –
Behandlung mit Treosulfan an
Tag 14 p.i.



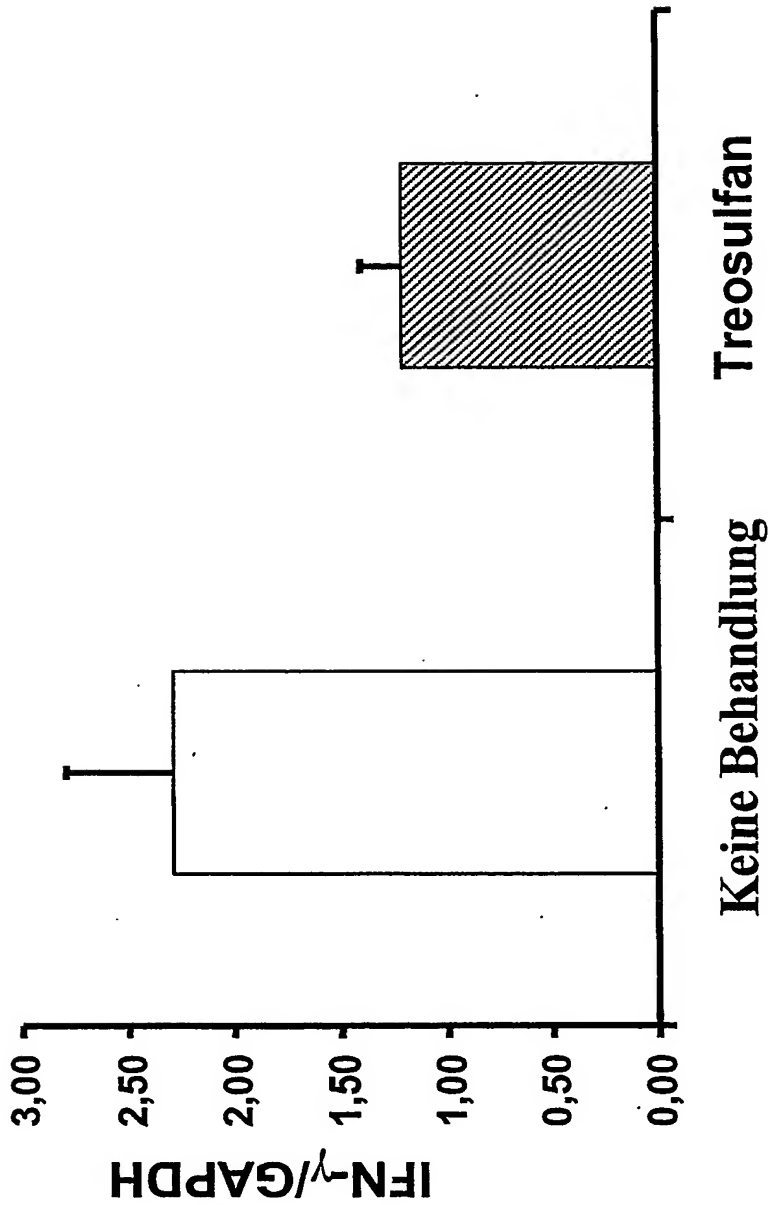
Figur 14

16/18



Figur 15

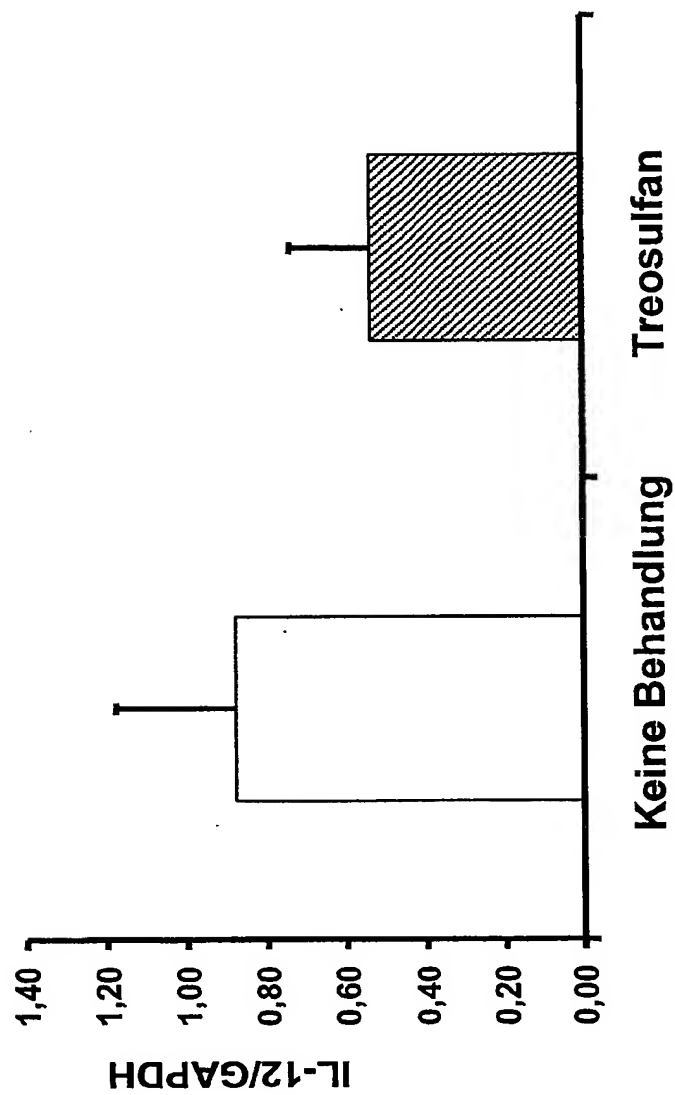
Quantitative PCR für IFN- γ –
Behandlung mit Treosulfan an Tag 0



Figur 16

18/18

Quantitative PCR für IL-12 –
Behandlung mit Treosulfan an Tag 0



Figur 17

10/524144

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/08957

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K31/21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01 32154 A (BAUMGART JOACHIM ;MEDAC KLINISCHE SPEZIALPRAEP (DE)) 10 May 2001 (2001-05-10) the whole document	1-8
A	OPENSHAW H, LUND B, KASHYAP A, ATKINSON R, SNIECINSKI I, WEINER L, FORMAN S: "Peripheral blood stem cell transplantation in multiple sclerosis with busulfan and cyclophosphamide conditioning: Report of toxicity and immunological monitoring" BIOLOGY OF BLOOD AND MARROW TRANSPLANTATION, vol. 6, no. 5a, 2000, pages 563-575, XP002263510 the whole document	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 December 2003

Date of mailing of the international search report

16/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Engl, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/08957

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0132154	A	10-05-2001	DE 19953517 C1 09-08-2001
			AT 251455 T 15-10-2003
			AU 1391801 A 14-05-2001
			BG 106772 A 28-02-2003
			CA 2389896 A1 10-05-2001
			CZ 20021562 A3 16-10-2002
			DE 50004024 D1 13-11-2003
			WO 0132154 A2 10-05-2001
			EP 1227808 A2 07-08-2002
			HU 0203277 A2 28-01-2003
			JP 2003513034 T 08-04-2003
			NO 20022109 A 01-07-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationaler Patentsymbol

PCT/EP 03/08957

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K31/21

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
A	WO 01 32154 A (BAUMGART JOACHIM ;MEDAC KLINISCHE SPEZIALPRAEP (DE)) 10. Mai 2001 (2001-05-10) das ganze Dokument	1-8
A	OPENSHAW H, LUND B, KASHYAP A, ATKINSON R, SNIĘCINSKI I, WEINER L, FORMAN S: "Peripheral blood stem cell transplantation in multiple sclerosis with busulfan and cyclophosphamide conditioning: Report of toxicity and immunological monitoring" BIOLOGY OF BLOOD AND MARROW TRANSPLANTATION, Bd. 6, Nr. 5a, 2000, Seiten 563-575, XP002263510 das ganze Dokument	1-8

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. Dezember 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

16/12/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Bevollmächtigter Beauftragter

Engl, B

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Patentnummer

PCT/EP 03/08957

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0132154 A	10-05-2001	DE 19953517 C1	09-08-2001
		AT 251455 T	15-10-2003
		AU 1391801 A	14-05-2001
		BG 106772 A	28-02-2003
		CA 2389896 A1	10-05-2001
		CZ 20021562 A3	16-10-2002
		DE 50004024 D1	13-11-2003
		WO 0132154 A2	10-05-2001
		EP 1227808 A2	07-08-2002
		HU 0203277 A2	28-01-2003
		JP 2003513034 T	08-04-2003
		NO 20022109 A	01-07-2002

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.